

## PCR-RFLP를 이용한 한우와 젃소고기의 MC1R 유전자변이 검출

고바라다<sup>1</sup>, 김용환, 박성도, 나호명, 김정남, 성창민, 이삼수

광주광역시 보건환경연구원  
(접수 2005. 8. 29. 게재승인 2005. 9. 23)

## Identification of MC1R gene variants of Hanwoo and Holstein meat using PCR-RFLP

Ba-Ra-Da Koh<sup>1</sup>, Yong-Hwan Kim, Seong-Do Park, Ho-Myung Na, Jeong-Nam Kim, Chang-Min Sung, Sam-Soo Lee

*Gwangju Metropolitan Health & Environment Research Institute, Gwangju, 500-210, Korea*  
(Received 29 August, accepted in revised form 23 September 2005)

### Abstract

The melanocortin 1 receptor (MC1R) encoded by the coat color extension gene (E) plays a key role in the signaling pathway of melanin synthesis. The primers for the amplification of bovine MC1R gene were designed based on a bovine MC1R gene sequence (GenBank accession no. Y19103). A size of 483 bp (482 bp for Hanwoo) was amplified by PCR, digested with Hpa II restriction enzyme and electrophoresed in 1.5% agarose gel. When the amplified DNA product (483 bp) was digested with Hpa II restriction enzyme, Hanwoo meat showed a single band of 482 bp, whereas two fragments of 325 bp and 158 bp were detected in Holstein, Angus and meat of Hanwoo/Holstein cross cow having back coat color phenotype, respectively. The results of this experiment indicate that new designed primers of bovine MC1R gene may be useful for identification of Hanwoo meat from Holstein, Black Angus and Hanwoo/Holstein cross cow meat.

Key words : MC1R gene, Coat color, PCR-RFLP, Hanwoo, Holstein

---

<sup>1</sup>Corresponding author

Phone : +82-62-571-0498, Fax : +82-62-571-0496

E-mail: barada@nvrqs.go.kr

## 서 론

소에서 모색(毛色)을 조절하는 유전자는 여러 가지 존재한다. 소에서 13번 염색체의 Agouti 좌위에 Agouti signaling protein (ASP) 유전자는 MC1R에서  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone (MSH)의 작용을 방해하며, Dexter종에서 짙은 갈색을 표현하는 tyrosinase related protein 1 유전자는 8번 염색체, 검정색과 빨간색을 조절하는 melanocortin 1 receptor (MC1R) 유전자는 18번 염색체의 extension 좌위에 존재 한다<sup>1-3)</sup>.

MC1R은 melanocyte 위에 존재하며 MSH와 adrenocorticotropin hormone (ACTH)과 상호작용에 의해서 melanin 합성을 상승시킬 수 있다<sup>4)</sup>. Melanin 합성은 MSH와 Agouti 단백질에 의해서 이들 두 가지 세포간 신호전달 분자들의 반대작용에 의해서 주로 조절되어진다. MC1R은 한 개의 G-protein coupled receptor인데 MSH(또는 ACTH)의 결합으로 한 개의 cAMP 의존신호전달체계를 촉발시켜 tyrosinase의 활성을 증가시켜 결과적으로 eumelanin(검정색소)의 합성을 증가시키게 된다<sup>1,5)</sup>. Agouti 단백질은 dermal papilla에서 분비되어지고, 인접한 각질세포들에서 의해서 생산된다. 털집(hair follicle)에서, Agouti 단백질은 MSH가 MC1R에 결합하는 것을 억제하기 때문에 tyrosinase 활성을 감소시키고, 그 영향으로 붉은 색소가 증가하게 된다.

포유동물에서 색소합성에 관여하는 MC1R 유전자의 돌연변이가 모색변이를 일으킨다는 사실이 규명됨에 따라 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 방법을 사용하여 소, 말, 돼지 그리고 면양 등의 다양한 축종을 대상으로 모색변이에 관한 연구가 이루어졌다<sup>2,5-7)</sup>.

소에서 붉은색과 검정색이 가장 흔한 모색이며 MC1R 유전자에 의해서 영향을 받으며, Angus와 Holstein과 같은 품종에서 볼

수 있다. MC1R 유전자는 두 개의 흔한 대립 유전자 ( $E^D$ 와  $e$ )를 가지고 있으며, 흔치 않은 대립유전자인  $E^+$ 를 wild type이라 부르며, 대부분의 품종들에서  $E^+$ 는 중성 대립 유전자 (neutral allele)인 것으로 보인다. 그래서  $E^D E^+$  소는 검정색이고,  $E^+ e$  소는 붉은 색이다.  $E^D$  대립유전자는 Agouti 유전자에 반응을 하지 않는다. 그러므로 이것은 진한 검정색의 털을 가진 소에서 선호되어질 수 있는 대립유전자이다.  $E^+$  대립유전자는 agouti 유전자에 반응을 하며 Brown Swiss 또는 Braunvieh와 같이 은회색에서 흑갈색을 가진 소에서 잘 나타나는 대립유전자이다<sup>2,8-12)</sup>.

한우, Holstein 그리고 Angus 품종간의 MC1R 유전자 염기서열을 비교분석한 결과 104번 아미노산을 지정하는 코돈에서 한우는 G 염기 하나가 결손됨으로써 발생한 Gly  $\rightarrow$  Val 아미노산의 전환에 착안하여 김 등<sup>13)</sup>과 정 등<sup>14)</sup>은 PCR-RFLP marker를 이용하여 제한효소처리 후 한우고기와 젓소고기 그리고 다른 품종에서 각각 다른 DNA band를 확인하였다. 그리고 정 등<sup>14)</sup>은 MC1R에 대해 RFLP와 달리 제한효소가 필요 없는 PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) 분석방법을 이용하여 품종 특이적인 SSCP 유전자형을 확인하여 한우육 판별법을 보고하였다<sup>15)</sup>. 그러나 이들의 방법은 안정적인 분석 결과를 얻을 수 있지만 MC1R 유전자의 변이를 확인하기 위해서 4% metaphore agarose gel 또는 polyacrylamide gel을 사용하여 분석시간이 길게 요구되는 단점이 있다.

따라서 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 소에서 MC1R 유전자의 변이부위를 PCR로 증폭한 후 제한효소로 처리하여 1.0~1.8%의 agarose gel에서 전기영동하여 특이밴드를 신속하게 확인할 수 있도록 정확하고 재현성 있는 PCR primer를 개발하기 위해서 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

본 연구에 사용된 공시재료는 광주지역 도축장에서 수의사의 판정을 받은 한우 20개체, Holstein 30개체, 한우와 Holstein 교잡우 2개체와 생우로 수입되어 검역을 받은 후 국내에서 사육되어 도축장에 출하된 black Angus 5개체, Hereford 17개체로부터 근육시료를 채취하였다.

### Genomic DNA 추출

근육조직 (10 ~ 30 mg)으로부터 genomic DNA의 추출은 Nucleic lysis solution (Promega<sup>TM</sup>, USA) 500  $\mu$ l에 풀어 65°C에서 30분 정도 반응시킨 후, phenol : chloroform (1 : 1) 500  $\mu$ l를 혼합하여 12,000 rpm에서 3분 정도 원심분리하여 단백질을 제거한 후 상층액을 isopropanol 600  $\mu$ l와 혼합하여 12,000 rpm에서 5분 정도 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 추출된 DNA는 70% ethanol로 2회 세척 후 건조하여 순수한 3차 증류수에 적당량 용해하여 30 ng/ $\mu$ l 농도로 준비하였다.

### Primer제작 및 반응조건

MC1R 유전자는 GenBank (Y19103)에 등록된 소의 MC1R 부위의 염기서열을 기초로 하여 Melano-F (5'-gTgAgTCTCgTggAgAACgTg-3')와 Melano-R (5'-CAgCATgTggACgTAgAggAC-3') primer를 설계하여 Bioneer (Korea)에 합성을 의뢰하였다.

PCR 반응을 위해 반응액은 template DNA 2  $\mu$ l, 각 10 pmol/ $\mu$ l의 primer 1  $\mu$ l, PCR Master Mix 2 $\times$  (Promega<sup>TM</sup>, USA) 12.5  $\mu$ l를 첨가하고 멸균증류수로 총 25  $\mu$ l로

조정하였다. 증폭은 PCR thermocycler (PTC-200, MJ Research, USA)를 사용하여 PCR 수행은 95°C에서 5분간 수행한 후 92°C/20초, 60°C/30초 그리고 72°C/30초간 3단계로 PCR을 35 cycles 수행하고, postelongation을 72°C에서 5분간 DNA 합성을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 20~80 mM Tris-acetate-EDTA (TAE) 완충용액과 DNA 염색을 위한 ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml)가 함유된 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 최종산물을 UV transilluminator와 AlphaEase<sup>TM</sup> 5.5 software (Alpha Innotech Co., CA, USA)를 이용하여 확인 분석하였다.

### 제한효소 처리에 의한 DNA 절단 및 전기영동

PCR 종료 후 MC1R 유전자의 제한효소 처리는 3  $\mu$ l의 증폭산물에 acetylated bovine serum albumin (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, 제한효소 완충용액 10 $\times$ (Promega<sup>TM</sup>, USA) 2  $\mu$ l, Hpa II 제한효소 (10 u/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l를 첨가하고 멸균 증류수로 총부피를 20  $\mu$ l로 조정하여 37°C에서 3시간 이상 반응하여 절단하였다. Hpa II 제한효소로 절단된 DNA 단편을 확인하기 위해서 20~80 mM TAE 용액과 DNA 염색을 위한 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 분리한 후 UV lamp하에서 특이밴드를 관찰하였다.

## 결 과

PCR-RFLP법을 이용하여 소의 모색에서 빨강 / 검정색을 발현시키는 MC1R 유전자 내의 변이를 확인하기 위하여 도축장에서 채취한 한우, Holstein, Hereford, Angus종 그리고 한우/Holstein 교잡종에 대하여 PCR을 실시한 결과 483 bp (한우 482 bp)의 PCR 산물을 얻을 수 있었는데, 60~71°C까지의 광범

위한 유전자 결합온도에서 단일 밴드의 PCR 산물을 얻을 수 있었다 (Fig 1).

흑백반의 Holstein, 흑색의 Angus종 그리고 한우/Holstein 교잡종에서는 2개의 밴드로 절단되어 GenBank에서 나타난 예상절편 부위와 일치하여 정확한 증폭이 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (Fig 2, 3).

MC1R 유전자에 대한 PCR법에 의한 증

폭산물에 대해 Guanine 염기 결손을 확인하기 위하여 Hpa II 제한효소를 이용하여 분석한 결과, 털색이 황갈색인 한우는 482 bp가 절단 되지 않았으며, 적갈색인 Hereford 종도 한우처럼 483 bp가 절단되지 않았으나, 일부 Hereford 종은 Holstein처럼 두개의 band로 절단되었다 (Fig 3).

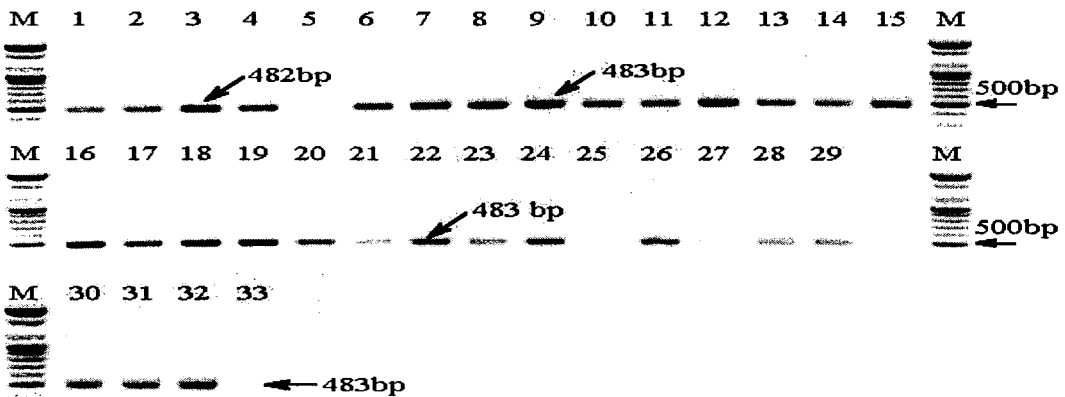


Fig 1. MC1R-specific PCR analysis of the Hanwoo, Holstein and Angus.

Lane M: 100bp DNA ladder(Bioneer, Korea); lane 1~5: Hanwoo DNA; 6~15: Holstein DNA; 16~25: Hereford DNA; 26~30: Angus DNA; 31~32: Hanwoo / Holstein cross cow DNA; 33: negative control.

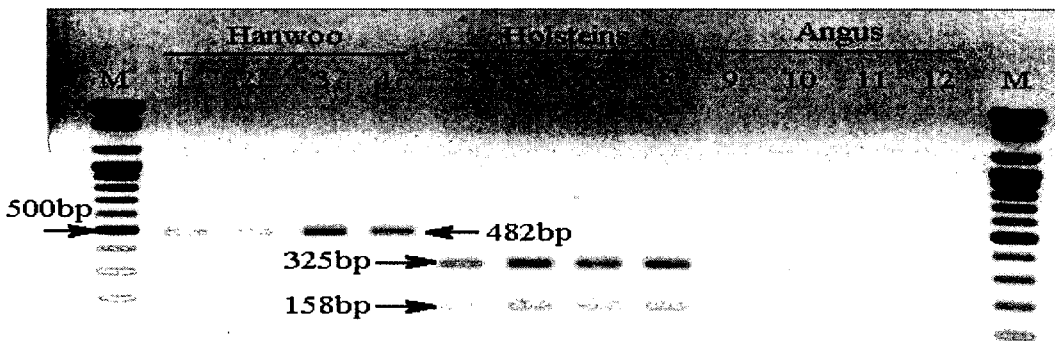


Fig 2. MC1R-specific PCR analysis of the Hanwoo, Holstein and Angus.

Lane M: 100bp DNA ladder(Bioneer, Korea); lane 1~4: Hanwoo DNA; 5~8: Holstein DNA; 9~12: Angus DNA.

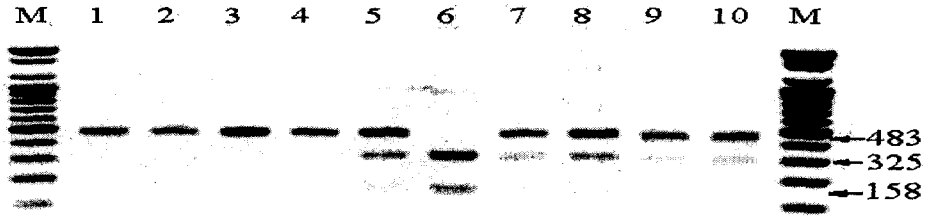


Fig 3. PCR-RFLP types of MC1R gene digested with Hpa II in 1.5% agarose gel electrophoresis.

Lane M: 100bp DNA ladder(Bioneer, Korea); lane 1~8: Hereford DNA; 9~10: Hanwoo / Holstein cross cow DNA.

## 고 찰

가축의 모색은 품종확인을 위한 지표로 항상 이용되어왔으며, DNA 수준에서도 각각의 차이를 구별할 수 있게 되었다. 모색과 관련된 중요한 표현형이 몇가지 유전자들에 의해서 조절되는데 그 중에서 E 좌위가 중요하다고 알려져 왔다<sup>8)</sup>. E 좌위에서 유전적 변이에 의해 melanocyte에서 검정색 (eumelanin) 또는 붉은색 (phaeomelanin)을 만들어 낸다. 최근 연구들에 의해서 E 좌위는 MC1R에 의해서 부호화 되어진다는 것이 증명되었다<sup>11,16)</sup>.

Melanocyte는 신체 전부위에 분포되어져 있으며 melanosome이라는 막으로 둘러싸인 입자들을 포함하고 있다. Melanosome은 두가지 형태의 melanin을 합성하는데 검정색과 갈색을 표현하는 eumelanin과 노란색과 붉은색을 나타내는 phaeomelanin이다. Eumelanin과 phaeomelanin은 dihydroxyphenylalanine와 tyrosine 전구체들로부터 형성되어지며 생산 조절은 MSH 또는 ASP 들중 하나에 의해서 melanocyte의 표면에 있는 수용체인 MC1R의 상호작용에 의해서 이루어진다. Eumelanin의 형성은 melanocyte의 표면 위에 MC1R에 MSH가 결합하여 이루어지는 반

면에 phaeomelanin의 생산은 ASP가 MC1R에 결합하여 이루어진다<sup>17)</sup>.

한우와 Holstein 그리고 Angus 품종간의 MC1R 유전자 염기서열을 분석 비교한 결과 104번 아미노산을 지정하는 코돈에서 Holstein과 Angus종은 GGT (Gly)의 염기서열로 이루어져 있으나 한우는 GGT → GTG로 두번째 G 염기 하나가 결손됨으로써 Gly → Val 아미노산으로 전환된 것이 확인되었으며, Angus 종은 99번 염기서열에서 단일염기의 치환으로 CTG (Leu)가 CCT (Pro)로 전환된 것으로 확인되었다<sup>14)</sup>. 이처럼 특정부위의 점 돌연변이(point mutation)에 의해 제한효소로 절단하였을 때 생기는 절편들의 길이가 품종마다 다양하게 나타나는 DNA의 다형성의 원리를 이용한 PCR-RFLP 분석방법은 유전병 관련 marker, 개인식별 및 범의학적으로 널리 적용되고 있다.

김 등<sup>13)</sup>과 정 등<sup>14,15)</sup>은 PCR-RFLP법과 PCR-SSCP을 이용하여 털색이 검정색인 품종과 황갈색인 품종에서 각각의 다른 DNA band를 확인하였다. 하지만 이들은 MC1R 유전자의 변이를 확인하기 위해서 제한효소 처리 후 절단된 DNA band의 크기가 작아져서 이를 확인하기 위해서 4% metaphore

agarose gel 또는 polyacrylamide gel에 전기영동을 한 후 silver stain을 사용하는데 많은 노력과 시간이 많이 소요되며 인체에 유해하다는 단점이 있었다. 따라서 본 연구에서는 MC1R 유전자의 변이를 확인하기 위해서 polyacrylamide gel 준비 및 염색 등의 불편한 단점을 보완할 수 있는 MC1R 특이 primer들을 제작하여 제한효소처리 후 일반 agarose gel 만으로 한우고기와 젃소고기를 쉽게 판별할 수 있는 방법을 개발하였다 (Fig 2, 3).

한편 젃소고기와 한우고기를 감별하기 위한 유전자 분석기술이 여러 연구자들에 의해서 시도된 바 있으나, 지금까지는 주로 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석방법을 이용하여 수행한 결과 실험의 재현성 등 여러 가지 문제점이 발생하여 실용화하지는 못하였다<sup>18)</sup>. 본 연구에서도 모색이 유사한 한우와 Hereford종에 대해 MC1R 유전자에 근거한 PCR-RFLP법을 이용한 결과 다른 연구자들과 결과와 마찬가지로 완벽한 구분은 되지 않았지만 일부 감별되는 개체도 있었다 (Fig 3). 이 차이는 Hereford종의 전체적인 모색은 적갈색이지만 얼굴, 하복부, 기갑부 및 꼬리에 부분적으로 흰 모색을 지니고 있기 때문인 것으로 추측된다. 따라서 소에서 흰 모색을 발현하는 유전자에 대한 보완 실험이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 모색에 근거한 MC1R 유전자를 이용하여 황갈색의 한우고기와 흑백반의 젃소고기, 흑색의 Angus종과 한우와 Holstein의 교잡우를 판별한 결과는 Fig 2와 3에서 보는 바와 같이 정확히 판별이 가능하였다. 따라서 젃소고기가 한우고기로 부정 유통되는 것을 판별할 수 있는 유전자 분석방법을 확보함으로써 한우 사육 농가뿐만 아니라 소비자도 보호할 수 있을 것으로 생각되며, 제도적으로 검사체계가 마련되어야 할 것으로 본다.

## 결 론

한우고기와 젃소고기의 감별을 위해 도축장에서 채취한 한우, Holstein, black Angus, Hereford 그리고 한우/Holstein 교잡종의 모색 유전자에 대한 분석결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

새로 고안된 PCR primer는 한우를 비롯한 모든 품종에서 483 bp (한우 482 bp)의 PCR 산물을 증폭하였으며, 다른 증폭산물은 만들지 않았다. 한우고기의 PCR 산물은 Hpa II로 절단되지 않았으나 Holstein, Angus 그리고 교잡우에서는 Hpa II에 의해서 절단된 두개의 band를 전기영동을 통해서 확인할 수 있었다. 한우와 모색이 유사한 적갈색의 모색을 가진 일부 Hereford 종의 PCR 산물은 Hpa II에 의해 절단되지 않아 한우와의 감별이 명확하게 이루어지지 않았다.

이상의 결과를 통하여 MC1R 모색 유전자의 변이부위에 대한 새로 고안된 primer들에 의한 PCR-RFLP 법이 한우고기와 젃소고기의 감별에 유용한 방법임을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Cone RD, Lu D, Koppula S, et al. 1996. The melanocortin receptors : Agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* 51 : 287-317.
2. Klungland H, Vage DI, Gomez-Raya L, et al. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome* 6 : 636-639.
3. Berryere TG, Schmutz SM, Schimpf RJ, et al. 2003. TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Anim Genet* 34 : 169-175.

4. Takeuchi S, Takahashi S. 1998. Melanocortin receptor genes in the chicken-tissue distributions. *Gen Comp Endocrinol* 112 : 220-231.
5. Vage DI, Klungland H, Lu D, et al. 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mamm Genome* 10 : 39-43.
6. Marklund L, Johansson M, Sandberg K, et al. 1996. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chesnut coat color in horses. *Mamm Genome* 7 : 895-899.
7. Kijas JMH, Wales R, Tomsten A, et al. 1998. Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150 : 1177-1185.
8. Hearing VJ, Tsukanmoto K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J* 5 : 2902-2909.
9. Jackson IJ. 1993. Color-coded switches. *Nature* 362 : 587-588.
10. Jackson IJ. 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Ann Rev Gene* 23 : 189-217.
11. Robbins LS, Nadeau, JH, Johnson KR, et al. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles results from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72 : 827-834.
12. Adalsteinsson S, Bjarnadottir S, Vage DI, et al. 1995. Brown coat color in Icelandic cattle produced by one loci extension and agouti. *J Hered* 86 : 395-398.
13. 김태현, 윤두학, 박응우 등. 2000. 소 품종별 melanocortin receptor 1 (MC1R) 유전자의 유전자형 빈도에 관한 연구. *동물자원지* 42 : 735-744.
14. 정의룡, 김우태, 김연수 등. 2000. 소 모색관련 유전자 MC1R의 PCR-RFLP Marker를 이용한 한우육 판별. *동물자원지* 42 : 379-390.
15. 정의룡, 김우태, 김연수 등. 2001. PCR-SSCP 기법을 이용한 소 MC1R 유전자의 다형성 분석 및 한우육 감별. *동물자원지* 43 : 45-52.
16. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, et al. 1992. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257 : 1248-1251.
17. Riley PA. 2003. Melanogenesis and melanoma. *Pigment Cell Res* 16 : 548-552.
18. 민병록, 한재용, 이무하. 1995. RAPD 기법을 이용한 쇠고기의 품종 (한우육, 유우육 (Holstein육), 수입우육) 구분. *동물자원지* 37 : 651-660.